製品コード RR260A

食品・環境分析用

TaKaRa

Kudoa septempunctata (18S rRNA) qPCR Detection Kit

説明書

v201302Da

本製品は、厚生労働省通知「*Kudoa septempunctata* の検査法について（暫定版）」（食安監発 0711 第 1 号）に記載のプライマー、プローブ配列で、リアルタイム PCR により *Kudoa septempunctata* を検出するためのキットです。キットにはリアルタイム PCR 試薬の他、定量用の陽性コントロールプラスミドが添付されています。

I. キットの内容（20 μl 反応、50 回分）

1.	*Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (2 × conc.)	500 μl
2.	Kudoa Primer/Probe Mix (10 × conc.) ＊1	100 μl
3.	dH_2O	1 ml
4.	ROX Reference Dye (50 × conc.)	20 μl
5.	ROX Reference Dye II (50 × conc.)	20 μl
6.	Kudoa Positive Control (2.5×10^7 copies/μl) ＊2	50 μl
7.	EASY Dilution (for Real Time PCR)	1 ml × 2 本

＊1： 蛍光標識プローブ（FAM-TAMRA 標識）を含んでいますので、遮光に留意してください。

＊2： リアルタイム PCR コンポーネント（1 ～ 5）に誤って混入すると、正しい検出反応を行うことができなくなります。コンタミネーション防止に留意してください。

II. 保存

－ 20℃

Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) は、融解後は 4℃で保存し、凍結融解を避けてください。4℃で 6 ヵ月安定です。長期保存が必要な場合は、最初の融解時に小分け分注して－ 20℃保存してください。

III. キット以外に必要な機器、試薬（主なもの）

・リアルタイム PCR 用増幅装置および専用チューブ
　Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
　Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
　Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）など
・卓上遠心機
・200 μl、20 μl、10 μl　各マイクロピペット
・マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付き）

IV. 操作上の注意

1）リアルタイム PCR 用増幅装置の取扱いは各装置の取扱い説明書に従ってください。

2）万一、プローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。

3）陽性と判定された検体は、さらに微生物学的な手法を用いて確認してください。

4）反応液の調製から検出まで、次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。各エリアにおいては、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

　○エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
　○エリア 2：検体の調製を行います。
　○エリア 3：検体の反応液への添加と、反応および検出を行います。

　本キットでは増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。また、コンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

5）本キットはリアルタイム PCR 用増幅装置での解析によって結果判定を行います。リアルタイム PCR 用増幅装置の各種 Auto 機能が適正に働かなかった場合は誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 用増幅装置の取扱説明書に従い、Manual 設定を行ってください。

V. 操作

※ DNA 抽出等の前処理法については、厚生労働省通知「*Kudoa septempunctata* の検査法について（暫定版）」（食安監発 0711 第 1 号）をご参照ください。

1. 陽性コントロール（検量線作成用スタンダード）の調製（エリア 3 で実施）
   Kudoa Positive Control を EASY Dilution (for Real Time PCR) で段階希釈し、2.5 × 10^7（原液）、2.5 × 10^5、2.5 × 10^3、2.5 × 10^1 copies/μl の溶液を作成する（1 反応系につき 4 μl 使用するので、反応系での最終コピー数はそれぞれ 1 × 10^8、1 × 10^6、1 × 10^4、1 × 10^2 になる）。

2. 下記に示す反応液を氷上で調製する。（エリア 1 で実施）
   検体サンプル等の鋳型以外のコンポーネントを必要本数＋α分調製し、各反応チューブに 16 μl ずつ分注して軽くキャップを閉める。その内の 1 本に陰性コントロールとして滅菌水 4 μl を加え、反応チューブのキャップをしっかり閉める。

   【Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズの場合】

	[1 反応]
Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus)	10 μl
Kudoa Primer/Probe Mix	2 μl
dH_2O	4 μl
検体サンプル or 陽性コントロール or 滅菌水	(4 μl)＊1
	20 μl

   【Life Technologise 社製リアルタイム PCR 装置の場合】

	[1 反応]
Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus)	10 μl
Kudoa Primer/Probe Mix	2 μl
ROX Reference Dye or Dye II ＊2	0.4 μl
dH_2O	3.6 μl
検体サンプル or 陽性コントロール or 滅菌水	(4 μl)＊1
	20 μl

   ＊ 1： 検体サンプル等の鋳型は、この段階では加えない。

   ＊ 2： StepOnePlus には ROX Reference Dye を、7500 Fast Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II を使用する。

3. 鋳型（DNA 溶液）の添加（エリア 3 で実施）
   2 で分注した反応液に、検体 DNA や検量線作成用スタンダード等の鋳型を 4 μl 添加し、チューブのキャップをしっかり閉める。
   蛍光測定を行うため、チューブに汚れが付かないように注意し、キャップを閉めるときは手袋を着用する。0.2 ml チューブ用の卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

4. リアルタイム PCR 反応の開始
   以下の PCR 条件でリアルタイム PCR を実施する。
   ※ リアルタイム PCR 装置の操作法は、各機種の取扱説明書をご参照ください。

   初期変性
   95℃　30 秒
   2 Step PCR
   45 サイクル
   95℃　5 秒
   60℃　30 秒（蛍光検出：FAM/SYBR）

5. 反応終了後、解析を行う。
   ※ 解析法については、厚生労働省通知「*Kudoa septempunctata* の検査法について（暫定版）」（食安監発 0711 第 1 号）をご参照ください。

VI. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
Thermal Cycler Dice® Real Time System Single（製品コード TP850/TP870）
Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)（製品コード RR390A/B）
EASY Dilution (for Real Time PCR)（製品コード 9160）
NucleoSpin® Tissue（製品コード 740952.10/.50/.250）

VII. 注意

- 本製品は食品分析および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[A6] PCR Notice
Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the us: 5,804,375,5,538,848,5,723,591,5,876,930,6,030,787 and 6,258,569. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product solely in Environmental Testing, Food Testing, Industrial Microbiology, including reporting results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, and also for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained from the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[L15] Hot Start PCR
Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

[L53a] Rox Reference Dye (Application Field)
Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,928,907. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product solely in Environmental Testing, Industrial Microbiology, including reporting results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, and also for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[M40] Thermostable RNaseH
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,422,888 and its foreign counterpart patent claims.

[M57] LA Technology
This product is covered by the claims 6-16 of U.S. Patent No. 5,436,149 and its foreign counterpart patent claims.

[M82] Tli RNaseH Plus
This product is the subject of the pending JP patent application.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201302Da